



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

(12) Offenlegungsschrift
(10) DE 197 55 642 A 1

(51) Int. Cl. 6:
C 12 Q 1/68
G 01 N 21/64
C 07 H 21/04
// C12Q 1/70

(21) Aktenzeichen: 197 55 642.6
(22) Anmeldetag: 15. 12. 97
(43) Offenlegungstag: 24. 6. 99

(11) Anmelder:
Centeon Pharma GmbH, 35037 Marburg, DE

(12) Erfinder:
Weimer, Thomas, Dr., 35075 Gladbach, DE
(56) Entgegenhaltungen:
US 53 91 480
WO 92 02 638 A1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

- (54) Markierter Primer für die Polymerasekettenreaktion
(57) Es wird ein markierter Primer für die Polymerasekettenreaktion beschrieben, der an den beiden Enden des Oligonukleotid-Stranges mit zwei unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen, einem Reporter- und einem Quencherfarbstoff, markiert ist und bei dem wenigstens die letzten beiden Basen am 3'-Ende des markierten Primers mit der zu amplifizierenden DNA-Sequenz nicht komplementär sind. Es wird außerdem ein Verfahren zum Nachweis einer DNA-Sequenz mittels der Polymerasekettenreaktion unter Einsatz des markierten Primers beschrieben, bei dem für die Amplifikation eine oder mehrere thermostabile DNA-Polymerasen eingesetzt werden, von denen eine auch Korrektoreigenschaften (proof-reading) hat und die nicht gepaarten Basen des markierten Primers zusammen mit dem daran befestigten Quencherfarbstoff freisetzt, wodurch die Fluoreszenz auf der Wellenlänge des Reporterfarbstoffes ansteigt und damit die Bildung der mit diesem Fluoreszenzfarbstoff markierten DNA-Sequenz angezeigt wird.

Für die erfindungsgemäße Polymerasekettenreaktion können verschiedene thermostabile DNA-Polymerasen eingesetzt werden. Hat die verwendete DNA-Polymerase die Eigenschaft des proof-readings, dann kann die Reaktion mit einer einzigen Polymerase durchgeführt werden. Andernfalls ist ein Gemisch aus mehreren thermostabilen Polymerasen einzusetzen, indem neben der Taq DNA-Polymerase z. B. auch noch die Pwo-, Vent- oder Tth-Polymerase zur Anwendung kommen können.

Das erfindungsgemäße Verfahren beruht auf der Erkenntnis, daß die ungepaarten Basen des Primers ein Angriffspunkt für die Polymerase mit Korrekturfunktion sind. Die eingesetzten thermostabilen DNA-Polymerasen weisen eine 3'→5'-Exonukleaseaktivität auf, der zur Freisetzung der nicht-hybridisierten Basen zusammen mit dem Quencherfarbstoff führt.

Das Verfahren zeichnet sich vor allem durch seine Einfachheit aus, weil nur zwei Oligonukleotide zur Durchführung der PCR erforderlich sind. Dies ist beispielsweise dann von Vorteil, wenn zum Nachweis variabler Zielfrequenzen wie von Viren konservierte Nukleinsäureabschnitte amplifiziert werden müssen bzw. gleichzeitig mehrere z. B. virale Parameter nachgewiesen werden sollen.

Die Erfahrung wird durch das folgende Beispiel näher erläutert:

Beispiel

Zum Nachweis von Hepatitis B Virus DNS wird diese zunächst mit Hilfe von Standardverfahren extrahiert (zum Beispiel Ishizawa M., Kobayashi Y., Miyamura T., Matsuma, S: Simple procedure of DNA isolation from human serum. Nucl. Acids Res. 1991; 19: 5792). Die Amplifikation wird wie folgt angesetzt:
Zu 10 µl der extrahierten DNA werden 5 µl Mastermix (5 µl 10×PCR Reaktionspuffer, der vom Lieferanten der Polymerase mitgeliefert wird), 4 µl des Primers 1 (siehe SEQ ID No. 1 des Sequenzprotokolls) (10 pMol/µl), 4 µl Primer 2 (siehe SEQ ID No. 2 des Sequenzprotokolls) (1 pMol/µl), 4 µl dNTPs (25 mM) und 0,25 µl thermostabile Polymerase mit proof-reading-Funktion (1' bis 1,5 units) werden mit 22,75 ml Wasser gemischt und folgenden Thermozyklen unterworfen:

1. Initialc Denaturierung für 1 Minute bei 90°
2. 35 Zyklen, jeweils 28 Sekunden bei 94°C Denaturierung und 1 Minute bei 62°C Annealing und Verlängerung
3. Kühlen bei 4°C bis zur Auswertung.

Die PCR-Reaktion wird in einem Fluoreszenzspektrometer ausgewertet. Dazu wird die Fluoreszenz bei der Reporter- und Quencherwellenlänge (518 nm für FAM oder 582 nm für TAMRA) gemessen und der jeweilige Quotient aus Reporter- und Quencher wird gebildet (RQ). Der Mittelwert der Quotienten dreier Negativkontrollen (RQ) wird davon abgezogen und der errechnete Wert als ΔRQ bezeichnet. Proben mit einem ΔRQ größer oder gleich 0,3 werden als positiv gewertet, Proben kleiner als 0,3 als negativ.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Angaben zur SEQ ID NO. 1:

| | | |
|-------------|--------------------|----|
| Länge : | 27 Basenpaare | 5 |
| Art : | Oligonucleotid | |
| Strangform: | Einzelstrang | |
| Topologie : | linear | 10 |
| Herkunft : | Chemische Synthese | |
| Merkmal : | Primer | 15 |

Sequenzbeschreibung:

5' GAA TTT GGA GCT ACT GTG GAG TTA CTC^{3'}

20

25

Angaben zur SEQ ID NO. 2:

| | | |
|-------------|--------------------|----|
| Länge : | 21 Basenpaare | |
| Art : | Oligonucleotid | 35 |
| Strangform: | Einzelstrang | |
| Topologie : | linear | |
| Herkunft : | Chemische Synthese | 40 |
| Merkmal : | Primer | |

30

40

45

Sequenzbeschreibung:

FAM-^{5'} AGT TCT TCT TCT AGG GGA CCT^{3'}-TAMRA

50

FAM und TAMRA sind Fluoreszenzfarbstoffe.

55

Patentansprüche

1. Markierter Primer für die Polymerasekettenreaktion, dadurch gekennzeichnet, daß er
 - an den beiden Enden des Oligonukleotid-Stranges mit zwei unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen, einem Reporter- und einem Quencherfarbstoff, markiert ist, und
 - wenigstens die letzten zwei Basen am 3'-Ende des markierten Primers mit der zu amplifizierenden DNA-Sequenz nicht komplementär sind.
2. Verfahren zum Nachweis einer DNA-Sequenz mittels der Polymerasekettenreaktion, dadurch gekennzeichnet, daß
 - einer der Primer an den beiden Enden seines Oligonukleotid-Stranges mit zwei unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen, einem Reporter- und einem Quencherfarbstoff, markiert ist,